蝶と蛾 *Trans. lepid. Soc. Japan* **53** (2): 103–109, March 2002

カラフトセセリ (Lepidoptera, Hesperiidae) の分子系統解析

麻生　紀章[1)]・関口　正幸[2)]

[1)]215-0006　川崎市麻生区金程 1-37-27; e-mail: b.major@cello.ocn.ne.jp
[2)]336-0021　さいたま市別所 5-20-15; e-mail: fwpd9876@mb.infoweb.ne.jp

Molecular phylogenetic analysis of *Thymelicus lineola* (Lepidoptera, Hesperiidae)

Noriaki Asou[1)] and Masayuki Sekiguchi[2)]

[1)]1-37-27, Kanahodo, Asao-ku, Kawasaki-shi, 215-0006 Japan; e-mail: b.major@cello.ocn.ne.jp
[2)]5-20-15, Bessho, Saitama-shi, Saitama, 336-0021 Japan; e-mail: sfwpd9876@mb.infoweb.ne.jp

Abstract Intra-species variation in *Thymelicus lineola* was investigated using gene analysis. Conjunction of mitochondrial genes encoding 16s rRNA and NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) revealed variation in a region-dependent manner, and two major groups were found. One is a group consisting of individuals distributed in the Far East, and another is a group made up of those distributed in Europe and North America. Individuals recently found in Hokkaido, Japan were regarded as members of the latter group. We discussed the origin of Hokkaido's *T. lineola* using these molecular data and statistical data on importation of grass, host plants of *T. lineola*.

Key words *Thymelicus lineola*, 16s rRNA, ND1, mtDNA, phylogeny.

はじめに

カラフトセセリ，*Thymelicus lineola* (Ochsenheimer, 1808) は日本国内では分布の記録が無かったが，1999 年に北海道紋別郡滝上町で初めて発見された (長沼，1999)．その後 2000 年夏期には同町周辺のさらに広い範囲で多数の個体の生息が確認された (伊東，2000)．この北海道のごく一部の地域で発生がみられたカラフトセセリについては，古くからこの地に生息していたものか，近年になって国外から侵入したものか，国外から侵入したとしたらどこからなのか，という疑問が生じていた．我々は北海道のカラフトセセリの遺伝子を国外産の個体の遺伝子と比較することにより，カラフトセセリ地域個体群における北海道産カラフトセセリの位置を検討した．また，我が国における牧草の輸入状況を調査し，カラフトセセリの国外からの人為的移入の可能性について検証した．

材料及び方法

解析に用いたカラフトセセリ個体は日本産 2 産地 4 個体，北米・ヨーロッパ産 4 産地 7 個体，極東産 3 産地 4 個体である．その採集地については Table 1 に記した．比較のために分析した *Thymelicus sylvestris* (英名 Small Skipper) はイギリス産，*Daimio tethys* (ダイミョウセセリ)，*Thoressa varia* (コチャバネセセリ) はいずれも日本産である．これら個体 (乾燥標本) の脚部から DNA を抽出し，これを鋳型として PCR を行った．配列分析にはミトコンドリアゲノムの 16s rRNA をコードする遺伝子 (16s 遺伝子) と NADH dehydrogenase subunit 1 をコードする遺伝子 (ND1 遺伝子) を用いた．これら遺伝子の部分配列を増幅するプライマーには Martin らの報告 (Martin *et al*., 2000) と同一の配列をもつオリゴヌクレオチドを用いた．増幅した遺伝子断片の塩基配列は ABI DNA 自動シークエンサーを用いて決定した．系統解析には PAUP4.0 を用い，系統樹の検定には bootstrap 法 (1,000 回試行) を適用した．

Table 1. *Thymelicus lineola* for molecular phylogenetic analysis.

area	country	number of specimens
Japan	Takinoue, Monbetsu, Hokkaido 紋別郡滝上町	2
	Nishi-okoppe, Monbetsu, Hokkaido 紋別郡西興部村	2
North America	Green Bay, Brown County, Wisconsin	2
	Ulster County, New York	2
Europe	Stockholm, Sweden	1
	Ripley, Surrey, England	2
Far East	Riv. Khrebtovyi, Sakhalin, Russia	2
	Nikolayevsk-na-Amure, Russia	1
	Yanji, Jilin, China 吉林省延吉	1

結　果

Fig. 1 に 16s 遺伝子の配列を北海道産，ウィスコンシン州産，サハリン産で比較した結果を示す．配列の比較は Higgins のアルゴリズムを用いて行った．Fig. 1 に見られるように，地域間の塩基置換は 220 番付近から 280 番付近までの AT リッチな領域 (青い枠で示した AT 繰り返し配列を含む) 近傍に特に集中している．この遺伝子の場合北海道産はウィスコンシン州産個体 1 と完全に一致する配列を与えたが，サハリン産とは赤枠で示した塩基座において異なる配列を与えた．特にサハリン産では 258 番から 261 番までの 4 塩基配列が挿入されている点は注目される．なお，北海道産は 4 個体，サハリン産は 2 個体で同一の配列を与えたのに対し，ウィスコンシン州産は 2 個体でわずかに異なる配列を与えた．以上のような 16s 遺伝子 (426–435 塩基) に対する配列分析を他の個体についても行ったが，ニューヨーク州産，イギリス産においても同一産地の個体は同一の配列を与えた．

次に ND1 遺伝子 (395 塩基) についても配列分析を行った．カラフトセセリの ND1 遺伝子分析領域中には 16s 遺伝子で見られたような繰り返し配列は見られなかった．また，ND1 遺伝子分析領域は同一産地では複数個体で同一の配列を与えた．これと 16s 遺伝子からの配列情報を結合した配列 (821–830 残基) を用いて作成した系統樹が Fig. 2 である．MP は最節約樹，NJ は近隣結合樹である．外群にはダイミョウセセリとコチャバネセセリを用いている．

まず系統樹の妥当性について俯瞰してみると，Fig. 2 の系統樹はいずれも，*T. sylvestris*，コチャバネセセリ，ダイミョウセセリの順でのカラフトセセリとの近縁性を示している．これまでの形態からの分類によれば，カラフトセセリは *T. sylvestris* と同属近縁種とされており，更にこの属はコチャバネセセリ属とともにセセリチョウ亜科に分類されている (Evans, 1949)．一方，ダイミョウセセリ属はチャマダラセセリ亜科に属すとされている (Evans, 1949)．従って今回の遺伝子系統樹における種間の相対的近縁性は従来からの形態系統と矛盾しない．なお，カラフトセセリ 16s 遺伝子で見られた AT 繰り返し配列は他種では見られなかった．

カラフトセセリ領域内での地域変異に目を移せば，MP 樹，NJ 樹いずれも中国，大陸ロシア，サハリンの「極東個体群」が「ヨーロッパ・アメリカ個体群」から分離してクラスター化する系統関係を与えている．このクラスター化の bootstrap 値は非常に高い値であった．さて，問題の北海道産であるが，これは地理的に近い極東個体群のクラスターには属さず，MP 樹ではヨーロッパ・北米個体群と並列に，NJ 樹ではヨーロッパ・北米個体群のクラスターに含まれた．

考　察

遺伝子系統樹: 今回の分析に用いた遺伝子の組み合わせは，Martin らによりジャノメチョウ科の系統関係の検討に有効なことが報告されている (Martin *et al*., 2000)．Martin らのこの報告で重要なことは，16s, ND1 それぞれの遺伝子 400 塩基レベル単独を用いて作成した遺伝子系統樹は，これまでの形態からの分類と矛盾する点も見られるが，両遺伝子の結合配列 800 塩基レベルを用いると，従来から

```
                   10         20         30         40         50
Hokkaido   GATTAAAAAA AA-TTAAAGG GCTGCAGTAT ATTGACTGTA CAAAGGTAGC
WI 1       GATTAAAAAA AA-TTAAAGG GCTGCAGTAT ATTGACTGTA CAAAGGTAGC
Sakhalin   GATTAAAAAA AAATTAAAGG GCTGCAGTAT ATTGACTGTA CAAAGGTAGC

                   60         70         80         90        100
Hokkaido   ATAATAATTA GTCTTTTAAT TGAAGACTTG TATGAAGGAT TTGATGAGAT
WI 1       ATAATAATTA GTCTTTTAAT TGAAGACTTG TATGAAGGAT TTGATGAGAT
Sakhalin   ATAATAATTA GTCTTTTAAT TGAAGACTTG TATGAAAGAT TTGATGAGAT

                  110        120        130        140        150
Hokkaido   ATTGACTGTC TCTTTATTAT ATTTAGAATT TAATTTTTTA GTAAAAAAGC
WI 1       ATTGACTGTC TCTTTATTAT ATTTAGAATT TAATTTTTTA GTAAAAAAGC
Sakhalin   ATTGACTGTC TCTTTATTAT ATTTAGAATT TAATTTTTTA GTAAAAAAGC

                  160        170        180        190        200
Hokkaido   TAAAATTTTT TTAAAAGACG AGAAGACCCT ATAGAGTTTT ATAATTAGTA
WI 1       TAAAATTTTT TTAAAAGACG AGAAGACCCT ATAGAGTTTT ATAATTAGTA
Sakhalin   TAAAATTTTT TTAAAAGACG AGAAGACCCT ATAGAGTTTT ATAATTAATA

                  210        220        230        240        250
Hokkaido   TAATTTAAAA TATATTATGA ATTATATA-T ATATATATAT ATATA-ATTT
WI 1       TAATTTAAAA TATATTATGA ATTATATA-T ATATATATAT ATATA-ATTT
Sakhalin   TAATTTAAAA TATATTATAA ATTATATAAT ATATATATAT ATATATATAT

                  260        270        280        290        300
Hokkaido   ATATTTA--- -AAATAATTA TAATAATTAT TTTATTGGGG TGATAGAAAA
WI 1       ATATTTA--- -AAATAATTA TAATAATTAT TTTATTGGGG TGATAGAAAA
Sakhalin   ATAATTATAA AAAATAATTA TATTAATTAT TTTATTGGGG TGATAGAAAA

                  310        320        330        340        350
Hokkaido   ATTAATTAAA CTTTTTATAT ATATAAACAT TAATTAATGA TTAAATGATC
WI 1       ATTAATTAAA CTTTTTATAT ATATAAACAT TAATTAATGA TTAAATGATC
Sakhalin   ATTAATTAAA CTTTTTTTAT AAATAAACAT TAATTAATGA TTAAATGATC

                  360        370        380        390        400
Hokkaido   CATAAATTAT GATTAAAAGA AAAAATTACC TTAGGGATAA CAGCGTAATT
WI 1       CATAAATTAT GATTAAAAGA AAAAATTACC TTAGGGATAA CAGCGTAATT
Sakhalin   CATAATTTAT GATTAAAAGA AAAAATTACC TTAGGGATAA CAGCGTAATT

                  410        420        430
Hokkaido   TTTTTTTTTA GTTCTTATAA AAAAAAAAGT TTGC
WI 1       TTTTTTTTTA GTTCTTATAA AAAAAAAAGT TTGC
Sakhalin   TTTTTTTTTA GTTCTTATAA AAAAAAAAGT TTGC
```

Fig. 1. Comparison of DNA sequences among *Thymelicus lineola* of Hokkaido, Wisconsin, and Sakhalin. Multiple comparison was performed by means of Higgins. -: gap, a blue frame: TA repeat, red frames: base positions with variation.

の形態からの系統と近いものが得られる点である．著者の一人関口も，この遺伝子の組み合わせにより得られた *Erebia* 属の遺伝子系統樹が従来の形態分類と大要において良く相関することを見出している (関口ら，2002)．今回の分析ではこのようなこれまでの基礎データの上に，セセリチョウ科にこの遺伝子の組み合わせを用いてみた．その結果，得られた系統樹はカラフトセセリ，*T. sylvestris*，コチャバネセセリ，ダイミョウセセリの近縁関係を従来の形態からの分類 (Evans, 1949) と矛盾しない形で与えた．今後更に分析種を増やし，セセリチョウ科系統関係の検討における当該系統樹の妥当性を検証する必要があろう．

Table 2. Imports of feed plants (Including grass hay). (Jan.–Dec. 1999).

country	USA	Australia	Canada	China	others	total
quantity (ton)	1,373,676	158,911	149,502	56,752	7,021	1,745,862
ratio (%)	78.7	9.1	8.6	3.2	0.4	100

Trade statistics, value of exports and imports. Ministry of Finance Japan. 大蔵省貿易統計.

カラフトセセリの地理変異: 北米大陸のカラフトセセリは1910年ごろヨーロッパからの輸入牧草に混じってカナダ・オンタリオ州に人為的に移入したとされている (Scott, 1986). 従って，今回得られたNJ樹における北米産とヨーロッパ産の近縁性は妥当性の高いものである．ただし，北米・ヨーロッパ集団と極東系集団の違いは，あくまでも遺伝子系統上の違いであり，亜種などの違いを示唆するものではない．しかし，北米・ヨーロッパ産個体と極東産個体の間には，僅かながら形態上の違いも見られるので，この点注意が必要である (Figs 3-11).

北海道のカラフトセセリ: 北海道のカラフトセセリは今回の分析遺伝子領域では4頭とも全く同一の配列を示したので，かなり均一性の高い集団であることが示唆される．このことは，北海道産が単一の集団をルーツとしていることを示すと思われる．系統関係からみれば，この集団が地理的に近い極東産クラスターに含まれない点は非常に特異である．一般的に種内地域個体群に関する遺伝子分析では，個体群の地理的結びつきと大変良く相関した系統関係が得られる場合が多く，今回の系統樹も北海道産以外は地理的結びつき (極東か北米・ヨーロッパかという面において) を良く反映している．この特異性の最も妥当な説明のひとつは，かつて北米産がヨーロッパからの輸入牧草に紛れて人為的に移入したように，北海道産も極東以外のいずれかの地域から人為的に北海道に移入したとするものであろう．後述するように，カラフトセセリはチモシーグラス等の牧草を食草とし，しかもセセリチョウとしては珍しく長期の輸送に耐えられる卵で越冬する (Thomas & Lewington, 1991). このような生態が，本種の人間活動に依存した分布域拡大の原因と思われる．ただし，今回の分析に用いた極東産が3産地4個体と少ないので，他の極東産地の個体を更に多数検討することにより，北海道産の遺伝子を持つ個体群が見出される確率が全くゼロとは言えない点には注意すべきであろう．また，今回分析した産地の個体からは16s, ND1両遺伝子とも北海道産と全く同じ遺伝子配列の個体は見いだせなかったので，そのルーツの地を特定するまでには至らなかった．

牧草の輸入: 以上の遺伝子分析の結果から，北海道産カラフトセセリが極東以外の産地から人為的に移入された可能性が示唆されたので，以下，遺伝子分析とは離れて北海道への牧草の輸入状況を検討してみた．

カラフトセセリの主な食草はチモシーグラス (*Phleum pratense*), オーチャードグラス (*Dactylis glomerata*) などのイネ科植物であり，北海道ではチモシーグラスに多くの幼虫が見出され，成虫もその周辺に生息していた (伊東, 2000). 日本はチモシーグラスを飼料用乾草として外国から輸入しているので，飼料用の牧草に混入して北海道へ移入した可能性が考えられる．飼料用植物の輸入について調べてみると，Table 2のようにアメリカおよびカナダからの輸入量が群を抜いて多いことがわかる．ついで，オーストラリア，中国の順になっており，アメリカとカナダで輸入総量の90%近くに及んでいる．そしてロシアからの輸入は統計上は無い．

大蔵省 (現財務省) 貿易統計は乾草だけでなく，輸入された飼料用植物全体の統計である．乾草の中でも特にカラフトセセリが好むチモシーグラスについて農林水産省植物検疫統計を参照してみると，1999年のチモシーヘイ (乾草) の輸入検査数量は304,624トンで，アメリカから153,934トン (50.5%), カナダからは150,677トン (49.5%) であり，この2国でほぼ100%となり，他国からは極めて少量となっている．

これらの統計資料から，北海道のカラフトセセリはアメリカ又はカナダから移入された可能性が高いことがうかがえる．

わが国では植物防疫法に基づき，麦の大害虫である「ヘシアンバエ」の分布地域からのムギ類及びカモジグサ属植物の茎葉の輸入を禁止している．このため，これらの茎葉が混入する恐れのある北アメリカの主要な牧草産地からの牧草の乾草の輸入については，害虫予防のため輸出国での薫蒸が条件付け

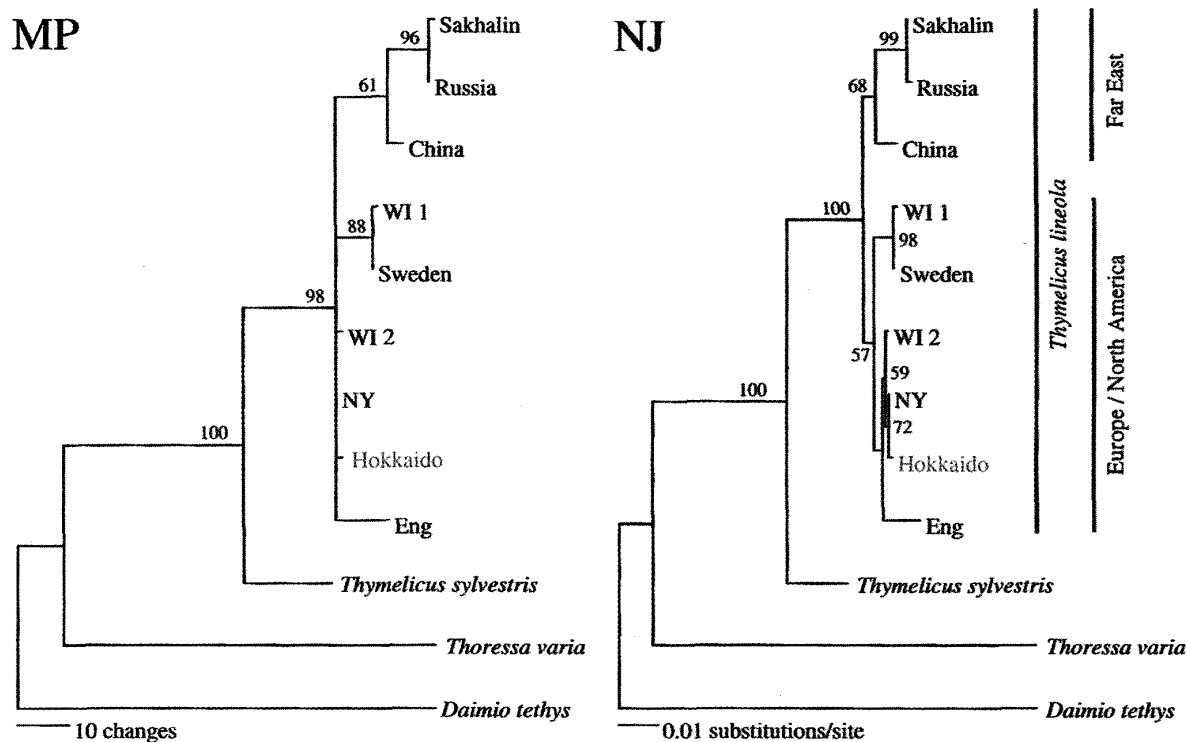
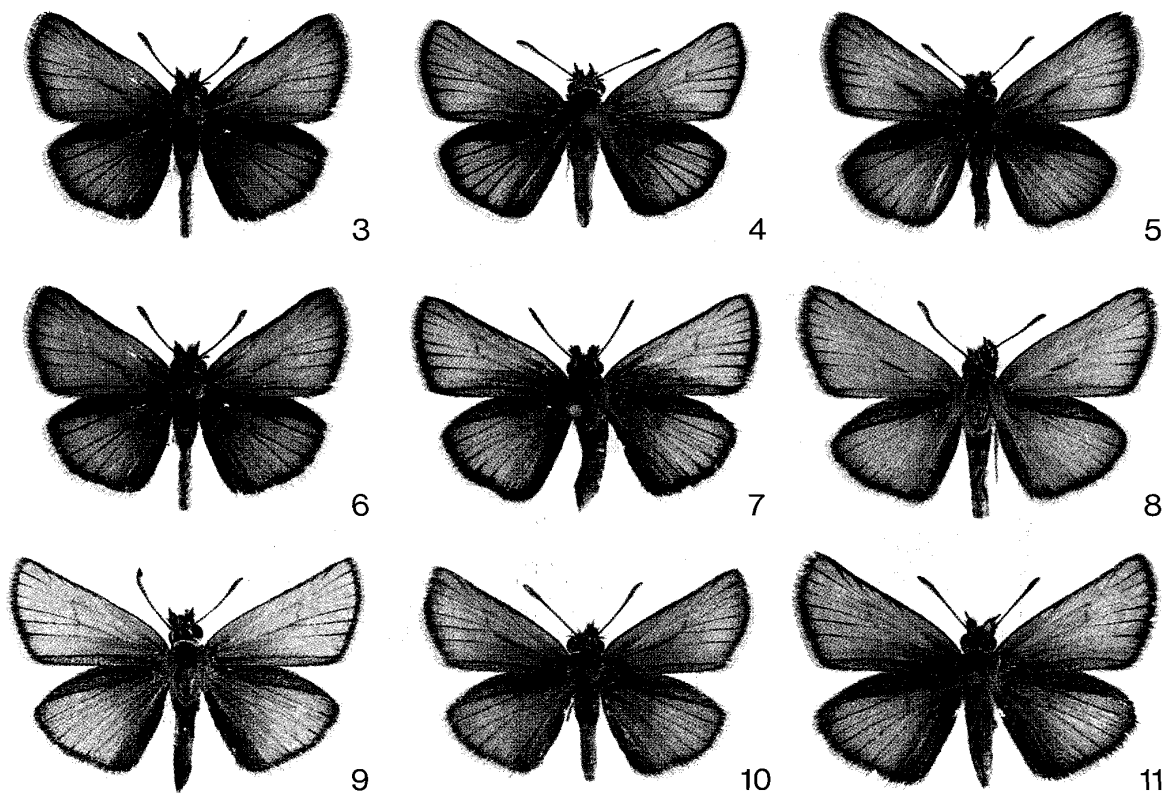



Fig. 2. Molecular phylograms (MP and NJ) prepared using conjunction (total approximately 825 base) of 16s gene (approx. 430 base) and ND1 gene (395 base). Numbers are bootstrap values (1,000 replications). The MP tree is a bootstrap consensus.

Figs 3–11. *Thymelicus lineola*. 3. Hokkaido, Japan, ♂. 4. *Ditto*, ♀. 5. Wisconsin, USA, ♂. 6. Surrey, England, ♂. 7. *Ditto*, ♀. 8. Nikolaeyevsk-na-Amure, Russia, ♂. 9. *Ditto*, ♀. 10. Sakhalin, Russia, ♂. 11. *Ditto*, ♀.

られている．しかしアメリカ合衆国の一部，およびカナダの一部からのチモシーグラスなどの乾草は，牧草だけを作っている地域では輸出時に薫蒸処理しないものもあるということである．その理由は，麦と交互輪作によって作られている牧草は，ヘシアンバエが付いている恐れがあるが，牧草だけの単作ではその心配がないためである．ただしその場合でも日本へ到着した時点で輸入検査が行われ，検疫対象となる害虫等が発見された場合は，殺虫のための薫蒸処理をするか，そっくり輸出国へ送り返すことになっている．これらの状況から，薫蒸を免れたチモシーグラス等の乾草に付着したカラフトセセリの卵が，アメリカ合衆国又はカナダから北海道に入ってきたという可能性はあり得る．

アメリカでのカラフトセセリは，イネ科牧草の害虫として駆除の対象となっている．牧草は家畜が食べるので殺虫剤による消毒を行いにくいため，殺虫性の強い遺伝子を組み込んだ品種が作出され，利用されているということである．それでもアメリカやカナダでカラフトセセリが根絶されていないのは，根絶する必要があるほどの害虫ではないということでもある．アメリカ大陸では，ヨーロッパからカナダへ移入されたカラフトセセリが，今ではアメリカ合衆国の東部に広く分布している．さらにアメリカ西部でも1960年頃にカナダ西部に移入されたカラフトセセリが生息地を拡大している．アメリカやカナダの例をみても，カラフトセセリが北海道各地に分布を拡散することはあり得る．また，輸入乾草は北海道だけでなく全国に供給されているので，他の地域でのカラフトセセリの発生も考えられる．

まとめ

1. ミトコンドリア16s遺伝子及びND1遺伝子の結合配列を用いてカラフトセセリの地域個体群について系統解析を行った．
2. 遺伝子系統樹はカラフトセセリ種内で大別して2つのグループが存在することを示唆した．それらは極東個体群よりなるグループとヨーロッパ・北米個体群よりなるグループである．
3. 近年北海道で得られたカラフトセセリは，地理的に近い極東個体群のグループには属さず，ヨーロッパ・北米個体群のグループに属した．
4. 以上の分子データと北海道への牧草の輸入に関する統計データから，北海道のカラフトセセリのルーツについて考察を加えた．

謝　辞

本研究を進めるにあたって，多くの方々のご協力をいただいた．貴重な標本類の提供と情報を与えていただいた，朝日純一，大島良美，小野克己，久慈一英，斎藤光太郎，斎藤太増光，斎藤基樹，添徹太郎，朝長政昭，仁坂吉伸，根本富夫，長谷　純，諸星重明，杠　隆史の諸氏に対し厚く御礼申し上げる．また，貴重な助言や情報を頂戴した，石川光一，川田光政，倉地　正，佐藤國男，久枝譲治の諸氏に対しても感謝の意を表する．そして特に築山　洋，千葉秀幸の両氏には標本の提供と共に，カラフトセセリをはじめセセリチョウ全般について多くのご教示をいただいたことを深謝申し上げる．さらに，この報告をするにあたって多大なご教示とご支援をいただいた中谷貴壽氏，および岩野秀俊氏に厚く御礼を申し上げたい．

引用文献

Evans, W. H., 1949. *A Catalogue of the Hesperiidae from Europe, Asia and Australia in the British Museum (Natural History)*: 1–6. The British Museum, London.
伊東秀晃，2000. カラフトセセリの分布状況－2000年の発生記録．蝶研フィールド (171): 10–14.
Martin, J. F., Gilles, A. & H. Descimon, 2000. Molecular phylogeny and evolutionary patterns of the European satyrids (Lepidoptera: Satyridae) as revealed by mitochondrial gene sequences. *Molec. Phylogen. Evol.* **15**: 70–82.
長沼二郎，1999. 日本初のカラフトセセリ発見記．季刊ゆずりは (3): 9–11.
農林水産省植物防疫所，1999. 植物防疫統計 (66): 289–290.
大蔵省関税局保税課統計係，1999. 大蔵省貿易統計 Dec. 1999: 108–109.
Scott, J. A., 1986. *The Butterflies of North America*: 433. Stanford University Press, Stanford.

関口正幸・中谷貴壽・新川　勉・木暮翠, 2002. *Erebia* 属 (Lepidoptera, Nymphalidae) の分子系統分析. 蝶と蛾 **53**: 1-11.

Thomas, J. & R. Lewington, 1991. *The Butterflies of Britain and Ireland*: 15-19. Dorling Kindersley, London.

Summary

1. Intra-species variation in *Thymelicus lineola* was investigated by means of gene analysis.
2. Phylograms prepared using conjunct sequences (>820 base) of mitochondrial genes encoding 16s rRNA and NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) suggested intra-species variation in a region-dependent manner.
3. Two groups were evident within *T. lineola*; one is a group consisting of individuals in the Far East (Russia, Sakhalin Island, China), and the other is a group made up of those in Europe (England and Sweden) and North America (New York and Wisconsin states of U.S.A.).
4. Individuals recently found in Hokkaido, Japan, did not belong to the "Far East" group but were members of the "Europe/North America" group.
5. We discussed the origin of Hokkaido's *T. lineola* using these molecular data and statistical data on importation of grass, host plants of *T. lineola*.

(Accepted October 24, 2001)

Published by the Lepidopterological Society of Japan,
5-20, Motoyokoyama 2, Hachioji, Tokyo, 192-0063 Japan